

## Fluorescence Polarisation 1

**Publication number:** DE10104938  
**Publication date:** 2002-08-14  
**Inventor:** BERLIN KURT (DE); DISTLER JUERGEN (DE)  
**Applicant:** EPIGENOMICS AG (DE)  
**Classification:**  
- **international:** C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68  
- **European:** C12Q1/68D2G  
**Application number:** DE20011004938 20010129  
**Priority number(s):** DE20011004938 20010129

A  
B  
C  
D  
E  
F  
G  
H  
I  
J  
K  
L  
M  
N  
O  
P  
Q  
R  
S  
T  
U  
V  
W  
X  
Y  
Z

Ref

### Abstract of DE10104938

A method for the analysis of the methylation of cytosine bases in genomic DNA samples, comprising the following steps:(a) the genomic DNA is treated in such a manner that cytosine is converted into uracil or a similar base regarding the base pairing behaviour in the DNA duplex, 5 methylcytosine is unchanged;(b) the chemically treated DNA is amplified using of at least one species of oligonucleotide (type A) as a primer in a polymerase chain reaction, wherein said type A oligonucleotide is left in solution with one or more species of fluorophore labelled nucleotides and one or more species of oligonucleotide (type B), wherein said type B oligonucleotide hybridises under appropriate conditions with its 3' end directly on or up to 10 bases from the position to be examined, and wherein said type B oligonucleotide is at least partly nuclease resistant;(d) the hybridised oligonucleotide (type B) is extended by means of a polymerase by at least one nucleotide, the extension being dependant upon the methylation status of the respective cytosine position in the genomic DNA sample;(e) the solution is incubated with a restriction enzyme capable of digesting nucleic acids, however incompletely digests the type B oligonucleotides and its extension products;(f) the fluorescence is measured whereby for each fluorescent label used one determines the degree of polarisation.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 101 04 938 A 1

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
C 12 Q 1/68

21 Aktenzeichen: 101 04 938.2  
22 Anmeldetag: 29. 1. 2001  
43 Offenlegungstag: 14. 8. 2002

DE 101 04 938 A 1

71 Anmelder:  
Epigenomics AG, 10435 Berlin, DE

74 Vertreter:  
Schubert, K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
10178 Berlin

72 Erfinder:  
Berlin, Kurt, Dr., 14532 Stahnsdorf, DE; Distler,  
Jürgen, 10825 Berlin, DE

56 Entgegenhaltungen:  
US 60 22 686 A  
Rapid quantitation of methylation differences at  
specific sites using methylation-sensitive single  
nucleotide primer extension (Ms-SNuPE).  
Gonzalzo,  
M.L. & Jones, P.A., Nucleic Acids Res. (1997) 25,  
2529-2531;  
A novel procedure for efficient genotyping of  
single nucleotide polymorphisms. SAUER, S. u.a.,  
Nucleic Acids Res. (2000) 28 (5) e13i-viii;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Fluorescence Polarisation 1

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse der Methylierung von Cytosin-Basen in genomischen DNA-Proben, die folgenden Schritte umfassend:

(a) die genomische DNA wird in einer solchen Art chemisch behandelt, dass Cytosin zu Uracil oder einer gleichartigen Base bezüglich des Basenpaarungsverhaltens in der DNA-Duplex umgesetzt wird, 5-Methylcytosin bleibt jedoch unverändert;

(b) die chemisch behandelte DNA wird unter Verwendung von mindestens einer Oligonukleotid-Spezies (Typ A) als Primer in einer Polymerasereaktion amplifiziert;

(c) das Amplifikat wird mit einer oder mehreren Spezies von Fluorophor-markierten Nukleotiden und einer oder mehreren Oligonukleotid-Spezies (Typ B) in der Lösung belassen, worin das Typ B Oligonukleotid unter geeigneten Bedingungen mit seinem 3'-Ende direkt an oder bis zu 10 Basen von der zu untersuchenden Position entfernt, hybridisiert und worin genanntes Typ B Oligonukleotid zumindest teilweise nukleaseresistent ist;

(d) das hybridisierte Oligonukleotid (Typ B) wird mittels einer Polymerase durch mindestens ein Nukleotid verlängert, wodurch die Extension vom Methylierungsstatus der jeweiligen Cytosin-Position in der genomischen DNA-Probe abhängig ist;

(e) die Lösung wird mit einer Phosphodiesterase inkubiert, die geeignet ist, Nukleinsäuren zu verdauen, jedoch die Typ B Oligonukleotide und deren Extensionsprodukte unvollständig verdaut;

(f) die Fluoreszenzpolarisation der Lösung wird gemessen, wobei man für jeden ...

DE 101 04 938 A 1

## Beschreibung

## Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse von Methylierungsmustern in genomischer DNA, zur Verwendung in der Analyse von hohen Durchsatzmengen, Forschung oder klinischen Einrichtungen. Dieses Verfahren nutzt die Bisulfitbehandlung und Fluoreszenzpolarisationsanalysetechniken aus.

## Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Beobachtungsebenen, die in den letzten Jahren in der Molekularbiologie studiert worden sind, haben sich auf Gene, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die Transkription der RNA zum Protein konzentriert. Es hat eine begrenzte Analyse der Regulationsmechanismen stattgefunden, die in Zusammenhang stehen mit der Genkontrolle. Genregulation, zum Beispiel auf welcher Stufe der Entwicklung eines Individuums ein Gen aktiviert oder inhibiert wird und der gewebespezifische Charakter dieser Regulierung wird nicht so gut verstanden. Jedoch kann sie mit einem hohen Grad an Wahrscheinlichkeit mit dem Ausmaß und Charakter der Methylierung des Gens oder Genoms korreliert werden. Von dieser Beobachtung ist es sinnvoll abzuleiten, dass pathogene genetische Störungen aus abweichenden genetischen Methylierungsmustern detektiert werden können.

## Stand der Technik

## Methylierung und Krankheit

[0003] Die Bemühungen des Humangenom-Projektes sind auf die Sequenzierung des Humangenoms konzentriert. Es wird erwartet, dass dieses bedeutenden therapeutischen und diagnostischen Nutzen für die Behandlung von Krankheiten erbringt. Diese Bemühungen waren bisher jedoch außerstande, sich einem signifikanten Aspekt genetischer Störungen, dem epigenetischen Faktor, zuzuwenden. Es hat sich gezeigt, dass die epigenetische Regulation der Gentranskription viele Störungen verursacht. Einer der signifikantesten, bisher identifizierten epigenetischen Mechanismen, ist die Methylierung von Cytosin gewesen. Die Methylierung von Cytosin in der 5-Position ist die einzige bekannte Modifikation von genomischer DNA. Obwohl die genauen Mechanismen, durch welche die DNA-Methylierung die DNA-Transkription beeinflusst, unbekannt sind, ist der Zusammenhang zwischen Krankheit und Methylierung gut belegt worden. Insbesondere scheinen Methylierungsmuster von CpG-Inseln innerhalb regulierender Bereiche des Genoms hoch gewebespezifisch zu sein. Daraus folgt daher, dass Missregulation von Genen durch Vergleich ihres Methylierungsmusters mit phenotypisch "normalen" Expressionsmustern vorhergesagt werden können. Die folgenden sind Krankheitsfälle, in Zusammenhang gebracht mit modifizierten Methylierungsmustern.

- Hals- und Nacken-Krebs (Sanchez-Cespedes, M. et al., "Gene promoter hypermethylation in tumours and serum of head and neck cancer patients", *Cancer Res.* 2000, Feb. 15; 60 (4): 892-5)
- Hodgkinsche Krankheit (Garcia, J. F. et al., "Loss of p16 protein expression associated with methylation of the p16INK4A gene is a frequent finding in Hodgkin's disease", *Lab. invest.* 1999 Dec; 79 (12): 1453-9)
- Magenkrebs (Yanagisawa, Y. et al., "Methylation of

the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability", *Int. J. Cancer* 2000, Jan. 1; 85 (1): 50-3)

- Prader-Willi/Angelmans Syndrom (Zeschneigh et al., "Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method", *Human. Mol. genetics* (1997) (6) 3pp 387-395)
- ICF Syndrom (Tuck-Muller et al., "CMDNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients", *Cytogenet. Cell. Genet.* 2000; 89(1-2): 121-8)
- Dermatofibroma (Chen, T. C. et al., "Dermatofibroma is a clonal proliferative disease", *J. Cutan Pathol.* 2000, Jan. 27 (1): 36-9)
- Hypertension (Lee, S. D. et al. "Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension", *J. clin. Invest.* 1998, Mar 1, 101 (5): 927-34)
- Autismus (Klauck, S. M. et al. "Molecular genetic analysis of the FMR-1 gene in a large collection of autistic patients" *Human Genet.* 1997 Aug; 100 (2): 224-9)
- Fragile X Syndrom (Hornstra, I. K. et al., "High resolution methylation analysis of the FMR1 gene trinucleotide repeat region in fragile X syndrome", *Hum. Mol. Genet.* 1993 Oct, 2(10): 1659-65)
- Huntingtonsche Krankheit (Ferluga, J. et al., "Possible organ and age related epigenetic factors in Huntington's disease and colorectal carcinoma", *Med. hypotheses* 1989 May; 29 (1): 51-4)

[0004] Alle obigen Dokumente werden hiermit als Referenz inkorporiert.

[0005] Der Stand der Technik umfasst zwei grundlegende Verfahren zur Analyse von Methylierungsmustern und Nukleinsäuren. Das erste betrifft ein Verfahren zur Analyse von Methylierungsmustern an spezifischen Stellen im Genom. Das zweite betrifft ein Verfahren, das Fluoreszenzpolarisation zur Analyse von Nukleinsäuren ausnutzt.

## Detektion von Cytosin-Methylierung in DNA

[0006] Die Modifikation der genomischen Base Cytosin zu 5-Methylcytosin repräsentiert den epigenetischen Parameter, welcher bis heute der am meisten untersuchte und am besten verstandene ist. Trotzdem ist die Charakterisierung dieses epigenomischen Parameters noch nicht auf gleicher Stufe mit der Genotypisierung von Zellen und Individuen. Es ließen sich noch weitere Verfahren für die massenhafte Analyse und Charakterisierung von Methylierungsmustern von Zellen entwickeln. Das inhaltsreichste Patent, das dieses Gebiet umfasst ist WO 99/28498, welches hiermit als Referenz inkorporiert ist. Genannte Erfindung stellt ein Mittel zur detaillierten Analyse von Methylierungsmustern bereit. Die offenbarte Erfindung bezweckt eine alternative Lösung unter Ausnutzen von Fluoreszenzpolarisations-Techniken in der Analyse von Methylierungsmustern bereitzustellen. Sie wird ein einfaches Methylierungsassay bereitstellen, besonders geeignet für eine klinische Umgebung mit mittlerem Durchsatz.

[0007] Standardverfahren der Sequenzanalyse wie Klonieren und PCR sind für die Analyse von Methylierungen ungeeignet, da kovalente Modifikationen an der DNA, wie Methylierungen, nicht erhalten bleiben.

[0008] Es werden gegenwärtig drei Verfahren, für die Unterscheidung zwischen 5-Methylcytosin und dem nicht me-

thylierten Cytosin in der DNA-Sequenz verwendet.

[0009] Das erste Verfahren benutzt Restriktionsenzyme. Restriktionsendonukleasen schneiden DNA-Sequenzen an spezifischen Orten, durch Erkennung einer spezifischen Sequenz, gewöhnlich 4–8 Basen lang. Diese Enzyme sind hochspezifisch in Bezug auf die Sequenz, die sie erkennen. In einigen Fällen, bekannt als "methylierungs-sensitiv", werden sie nicht an der methylierten Version der Erkennungssequenz schneiden. Infolgedessen können methylierungs-sensitive Enzyme verwendet werden, um Methylierung innerhalb von Restriktionsenzym-Stellen zu identifizieren.

[0010] Die Position der Schnitte kann durch Gel-Elektrophorese bestimmt werden, gefolgt von Blotting und Hybridisierung. Dieses Verfahren hat sich aus zwei Gründen nicht als nützlich für die effiziente Identifikation von methylierten CpG-Stellen im Genom erwiesen. Erstens sind die meisten CpG-Inseln, die methyliert sind, nicht innerhalb der Erkennungssequenz der meisten Restriktionsenzyme.

[0011] Zweitens ist die Empfindlichkeit dieses Verfahrens extrem niedrig (Bird, A. P.; Southern, E. M.; J. Mol. Biol. 118, 27–47). Die Empfindlichkeit kann durch Amplifikation der Region nach Restriktionsendonuklease-Verdau verbessert werden. Zwei Primer werden benutzt, welche die Erkennungsstelle des Enzyms flankieren. Im Falle dass der Verdau stattfindet, wird sich die Amplifikation nicht ereignen. Die Amplifikationsprodukte können dann durch Blotting und Hybridisierung analysiert werden, um die Stelle des Schnitts zu identifizieren. In der Theorie kann die Auflösung dieser Technik ein Basenpaar sein. Weil sie jedoch höchst arbeitsintensiv und kostspielig ist, ist sie keine praktische Lösung zur Analyse von Methylierungsmustern im großen Umfang (Shemer, R. et al., PNAS 93, 6371–6376).

[0012] Das zweite Verfahren nutzt das Sequenzierungsverfahren, entwickelt von Maxam Gilbert, zur 5-Methylcytosin-Identifikation aus. Die Technik schließt die partielle chemische Spaltung der gesamten DNA, gefolgt von Ligation, Amplifikation und Hybridisierung ein. In der Theorie können Bereiche mit einer Größe von weniger als 1000 Basenpaaren analysiert werden. Jedoch ist dieses Verfahren so kompliziert und unzuverlässig, dass es selten benutzt wird.

#### Bisulfit-Behandlung

[0013] Das bevorzugte Verfahren der Methylierungs-Analyse schließt eine chemische Modifikation der DNA-Sequenz ein. Das Verfahren basiert auf der Bisulfit-Umwandlung von Cytosin zu Uracil. DNA wird denaturiert und dann unter Verwendung einer Bisulfit-Lösung behandelt. Das resultiert in der Umsetzung von Cytosin zu Uracil, was die methylierten Cytosine unmodifiziert lässt. Uracil reagiert als Analogon von Thymin zu Zwecken der Basenpaarung, im Gegensatz zu Cytosin. Als ein Ergebnis der Bisulfit-Behandlung der DNA sind Stränge, die ursprünglich komplementär zueinander waren, wobei die codierenden und Template-Stränge nicht länger komplementär sind.

[0014] Oligonukleotid-Primer für die Amplifikation eines jeden Bisulfit-behandelten Stranges können dann konstruiert werden. Enzymatische Amplifikation der Sequenz resultiert im Einbau von Thymin-Nukleotiden an den Positionen, die in der Originalsequenz Cytosin waren.

[0015] Amplifikation der mit Bisulfit-behandelten DNA, Bisulfit-spezifische Primer verwendend, resultiert in der Bildung eines komplementären Stranges, dessen Sequenz abhängig ist von Methylierungs-Status der genomischen Probe und demzufolge einzigartig gegenüber dem ursprünglichen komplementären Strang vor der Bisulfit-Behandlung. Die Bisulfit-Behandlung und nachfolgende Amplifikation resul-

tiert deshalb in der Bildung von 4 einzigartigen Nukleinsäurefragmenten. Diese vier Stränge enthalten alle dieselbe Information, voraussetzend dass die Methylierung symmetrisch gewesen ist, was heißt, dass beide Stränge der CpG-Position methyliert worden sind. Der Methylierungs-Status jeder CpG-Position kann deshalb vier mal unabhängig bewertet werden.

[0016] Gebräuchliche Verfahren zur Bewertung des Methylierungs-Status einer in der CpG-Position mit Bisulfit umgesetzten Sequenz enthalten chromatographische Standard-Analysen, Hybridisierungsanalyse oder massenspektroskopische Analyse.

[0017] Alle Verfahren erfordern die Reinigung der PCR-Produkte, beispielsweise durch Gel-Elektrophorese, die auch direkt zur Analyse dienen kann. In der Hybridisierungsanalyse werden die Bisulfit-behandelten und PCR-amplifizierten Nukleinsäuren chemisch markiert und zu komplementären Oligonukleotiden hybridisiert. Die amplifizierten Fragmente werden untersucht, zwei markierte Oligonukleotide verwendend, eins davon ist spezifisch für unmethylierte DNA und deshalb CpG-haltig und ein anderes, spezifisch für methylierte DNA, welches kein CpG enthält. Die Hybridisierung wird dann durch ein Assay für die Markierung detektiert. Diese Form der Analyse kann in Form eines DNA-Arrays durchgeführt werden, das eine Analyse von hohen Durchsatzmengen erlaubt. Ein alternatives Verfahren, unter Verwendung der MALDI Massenspektrometer-Analyse von Nukleinsäuren, ist von Kirpekar, F. et. al. "DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry", Nucleic Acid Research: 26, 2354–9 beschrieben worden.

#### Fluoreszenz-Assays

[0018] Das offenbarte Verfahren stellt eine neue Anwendung für eine bestehende Form von Fluoreszenz-Assays bereit, um eine neuartige Lösung des Problems der Analyse von chemisch modifizierter, methylierter genomischer DNA-Sequenz bereitzustellen.

[0019] Die Verwendung von Fluoreszenz-Techniken zur Analyse kleiner Biomoleküle ist wohlbekannt. Gegenwärtig gibt es vier kommerziell erhältliche Verfahren für die Röhrenlumineszenz-Analyse (closed tube) enzymatischer Amplifikationsprodukte. Diese sind Taqman-, Molecular Beacons-, LightCycler- und Amplifluor-Assays. Alle basieren auf dem Gebrauch von Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET). FRET ist eine Form von molekularem Energietransfer, wobei Energie zwischen Donor- und Akzeptor-Spezies übergeht. Energie geht strahlungslos zwischen einem Akzeptor-Molekül und einem Donor-Molekül über. Der Donor absorbiert ein Photon und überträgt dieses strahlungslos auf das Akzeptor-Molekül, und veranlasst es dadurch zu fluoreszieren. Wenn zwei Fluorophore, deren Anregungs- und Emissions-Spektren überlappen, einander sehr nahe sind, wird die Anregung eines Fluorophors diesen Licht emittieren lassen bei Wellenlängen, die vom zweiten Fluorophor absorbiert werden und ihn anregen und ihn dann wieder veranlassen zu fluoreszieren.

[0020] Alle Verfahren, basierend auf FRET, sind durch relativ hohe Signal-Rausch-Verhältnisse und ein gute Befähigung zwischen positiven und negativen Reaktionen zu unterscheiden, charakterisiert. Jedoch sind sie alle begrenzt in dem Sinne, dass entweder eine zweifach markierte Sonde oder Primer oder zwei separate Sonden pro Target verwendet werden müssen. Das kompliziert die Sonden-Gestaltung und -Synthese erheblich. Zusätzlich, weil sie alle Markierungen mit schnell abklingender Fluoreszenz und breiten Emissionspeaks einsetzen, sind die Möglichkeiten zur Mehrfachdetektion begrenzt. Die Erfindung schlägt die Ver-

wendung von Fluoreszenzpolarisierung an Stelle von FRET vor.

### Fluoreszenzpolarisierung

[0021] Die meisten Fluoreszenz-Assays nutzen die Fluoreszenztransfereigenschaften von Donor- und Akzeptorgruppen aus, um die Eigenschaften kleiner Biomoleküle zu beobachten. Die Verwendung von Fluoreszenzpolarisierungstechniken war bis vor kurzem auf kleinere Analyte im Bereich von einem Molekulargewicht von ca. 1000 Dalton begrenzt. Diese ist hauptsächlich bei einer Zahl von Immunoassays und für die Messung von Mikroviskosität und molekularem Volumen benutzt worden. Einer der Hauptvorteile der Fluoreszenzpolarisierungstechniken im Vergleich zu anderen Verfahren ist, dass sie die Analyse von homogenen Lösungen erlaubt, das heißt es besteht kein Bedarf an Reinigungsverfahren.

[0022] Der Begriff der Fluoreszenzpolarisierung ist schon seit den Jahren ab 1920 bekannt gewesen. Es ist eine Messung von zeitgemittelten Rotationsbewegungen von fluoreszierenden Molekülen.

[0023] Die Fluoreszenzpolarisierungstechnik erlaubt die Beobachtung von Änderungen in den Rotationseigenschaften von Molekülen in einer Lösung. Moleküle in Lösung rotieren und taumeln um vielfache Achsen. Fluoreszenzpolarisierung beruht auf der Eigenschaft, dass linear polarisiertes Licht durch ein stationäres fluoreszierendes Molekül emittiert wird. Wenn linear polarisiertes Licht verwendet wird, um ein fluoreszierendes Molekül zu bestrahlen, wird das Molekül linear polarisiertes Licht zwischen Anregung und Emission nur dann emittieren, wenn es stationär ist. Größere Moleküle, d. h. solche von größerem Molekulargewicht und/oder Volumen, taumeln langsamer um ihre Achsen als kleinere Moleküle. Da der Grad an Polarisierung des durch das fluoreszierende Molekül emittierten Licht von dem Grad der Bewegung der Moleküle abhängig ist, ist es möglich zwischen kleineren und größeren Molekülen zu unterscheiden, basierend auf dem Grad der Polarisierung des Lichts.

[0024] In Fluoreszenzpolarisierungstechniken, wird das fluoreszierende Molekül zuerst durch polarisiertes Licht angeregt. Die Polarisierung der Emission wird gemessen durch Messung der relativen Intensität der Emission (i) parallel zur Ebene des polarisierten Anregungslichts und (ii) senkrecht zur Ebene des polarisierten Anregungslichts. Eine Änderung in der Taumelrate aufgrund einer Änderung in Größe und/oder Starrheit wird begleitet von einer Änderung im Verhältnis zwischen der Ebene des polarisierten Lichts und der Ebene der emittierten Fluoreszenz, d. h. einer Änderung in der Fluoreszenzpolarisierung. Die beobachtete FP einer Spezies wird durch die Perrin-Gleichung beschrieben und ist abhängig vom Verhältnis der rotatorischen Relaxationszeit und der Fluoreszenz-Lebensdauer.

[0025] Fluoreszenzpolarisierung (im weiteren als FP bezeichnet) wird als Verhältnis von polarisiertem zu nicht polarisiertem Licht ausgedrückt. Als solches hat es einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Formen der Fluoreszenzdetektion, da es unabhängig ist von der anfänglichen Fluoreszenzkonzentration in der Lösung. So lange die Menge an Fluoreszenz noch deutlich detektierbar ist, können exakte Ergebnisse gegeben werden. Die FP-Differenz zwischen komplett gebundener und komplett ungebundener DNA stellt den vollständigen dynamischen Bereich der FP dar. So lange eine statistisch signifikante Differenz auf die Wechselwirkung niedermolekularer, Fluorophor-markierter Nukleotide und solchen, eingebaut in größere Nukleinsäuremoleküle zurückgeführt werden kann, kann FP eine nützliche Verfahren zur Detektion von chemischen Wechselwir-

kungen sein. Jedoch wird es aufgrund der lokalen Bewegung des Fluorophors vielleicht nicht immer möglich sein, die Werte für die Reaktionen vorauszusagen und es wird erforderlich sein, diese empirisch abzuleiten.

5 [0026] Für ein System in welchem ein Fluorophor an eine Nukleinsäure mit geringem Molekulargewicht oder Volumen gebunden ist und dann in einen Oligonukleotid-Primer, hybridisiert mit einer größeren Nukleinsäure, eingebaut wird, kann die beobachtete Fluoreszenz (P) wie folgt beschrieben werden:

$$P = P_{\max} [NTP]b + P_{\min} ([NTP]i - [NTP]b)$$

15 worin  $P_{\max}$  die beobachtete Polarisierung für Fluoreszenzmarkierte NTPs ist, die in den Oligonukleotid-Primer eingebaut wurden.  $P_{\min}$  ist die beobachtete Polarisierung des nicht eingebauten, Farbstoff-markierten dNTPs, wobei  $[NTP]i$  die anfängliche Konzentration des Fluoreszenzfarbstoff-markierten dNTPs ist und  $[NTP]b$  ist die Konzentration des eingebauten Farbstoff-markierten dNTP.

[0027] Es ist klar, dass Fluoreszenzpolarisierung alle Verfahren der Analyse von polarisiertem Licht einschließt, das von einer Fluorophor-Gruppe emittiert wird, die an ein dNTP gebunden oder in einer Polynukleotidgruppe vereinigt ist. Das ist Stand der Technik und wird von M. E. Jolley, J. Analytical Toxicology 1981 (5) 236–240 beschrieben, was hiermit als Referenz integriert wird.

[0028] Die Anwendung von FP-Techniken zur Nukleinsäure-Analyse wurde in der Patentanmeldung EP 0382433 B1 offenbart, die hiermit als Referenz integriert wird. Der Gebrauch von FP zur Nukleinsäuresequenz-Analyse wurde in den Patentveröffentlichungen WO 92/18650 und WO 00/11220 offenbart, welche hiermit als Referenz integriert werden, und welche im Stand der Technik bekannt sind. Jedoch ist die Anwendung der Fluoreszenzpolarisierung als ein Werkzeug zur Analyse von DNA-Methylierungsmustern bisher nicht bekannt. Die Aufgabe der Erfindung liegt in der Analyse dieser speziellen Form von Nukleinsäure-Sequenzen. Die Analyseverfahren sind gegenwärtig nur unter Verwendung von Chromatographie-, Hybridisierungs- und MALDI Massenspektrometer-Techniken möglich.

### Zusammenfassung der Erfindung

[0029] Die Erfindung ist ein Verfahren zur Detektion von DNA-Methylierungsmustern. Der Stand der Technik besteht aus verschiedenen Verfahren zur Analyse von mit Bisulfit umgewandelten genomischen Sequenzen. Jedoch ziehen alle zwangsläufig ein zweistufiges Verfahren nach sich, worin die Bisulfit-Umsetzung von einer PCR-Amplifikation und nachfolgender Analyse gefolgt wird. Alle gegenwärtigen Analyse-Verfahren erfordern die Reinigung der Nukleinsäure-Produkte nach der enzymatischen Amplifikation, gewöhnlich durch eine Form von Gel-Elektrophorese. Die vorliegende Erfindung stellt eine signifikante Verbesserung des Standes der Technik bereit, indem die Bisulfitsequenz-Analyse in homogener Lösung ausgeführt werden kann. Dies gestattet die Analyse der Sequenz im geschlossenen Röhrchen, d. h. gleichzeitig mit oder nach Beendigung der enzymatischen Amplifikation, ohne dass eine weitere Reinigung notwendig ist. Zusätzlich kann das erfindungsgemäße Verfahren an andere Diagnoseverfahren angepasst werden, beispielsweise high density DNA-Chip-Analyse. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt ein kosteneffektives Analyseverfahren bereit. Die Ergebnisse sind Minuten nach Durchführung der methylierungsspezifischen Reaktion erhältlich. [0030] Die vorgeschlagene Erfindung stellt eine innova-

tive Lösung des Problems dar, und zwar bereit durch Bereitstellung einer neuartigen Anwendung bekannter Verfahren, welche die folgenden Schritte umfasst:

- a) Behandlung einer Nukleinsäure-Probe mit einer chemischen Lösung, um das nicht methylierte Cytosin zu Uracil umzusetzen,
- b) Amplifizierung der behandelten Nukleinsäure unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern, die für die umgesetzte Sequenz spezifisch sind,
- c) Hybridisierung genannter Amplifikate mit Oligonukleotid-Primern,
- d) Verlängern der genannten Primer mittels Fluorophor-markierten Oligonukleotid-Sonden und Polymerase,
- e) Verdauen der Reaktionslösung mit Phosphodiesterase,
- f) Detektieren der Fluoreszenzpolarisation der markierten Nukleotide.

#### Detaillierte Beschreibung

**[0031]** Die Methodik umfasst die folgenden Schritte: Zuerst muss die genomische DNA-Probe aus Gewebe oder zellulären Quellen isoliert werden. Bei Säugetieren, vorzugsweise Menschen, kann die DNA-Probe aus jedem Gewebe genommen werden, von dem vermutet wird, dass die Target-Region innerhalb des Genoms zu exprimieren. Für Säugetiere, vorzugsweise Menschen, können solche Quellen Zell-Linien, Blut, Sputum, Faeces, Urin, Cerebrospinalflüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, zum Beispiel Gewebe aus Augen, Gedärme, Niere, Gehirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber sowie histologische Schnitte einschließen. Die Extraktion kann mit den Mitteln erfolgen, die dem Fachmann geläufig sind, diese schließen die Verwendung von Detergentien, Aufschluss mit Ultraschall und Vortexing mit Glasperlen ein. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel findet die Extraktion jedoch in einer kleinen Menge von Öl statt, um den DNA-Verlust zu minimieren. Wenn die Nukleinsäuren extrahiert worden sind, wird die genomische, doppelsträngige DNA zur Analyse verwendet.

**[0032]** In einer bevorzugten Ausführungsform kann die DNA vor der chemischen Behandlung gespalten werden, und zwar durch alle Mittel im Stand der Technik bekannten Mittel, insbesondere Restriktionsendonukleasen. Genannte Endonukleasen können Cytosin in der 5'-CpG-3'-Umgebung in ihrer Erkennungssequenz einschließen, so dass die DNA nur gespalten wird, wenn die Cytosine in der Erkennungssequenz in der unmethylierten Form vorliegen.

**[0033]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können die resultierenden Schnitt-Enden der gespaltenen DNA zu kurzen, doppelsträngigen Nukleinsäure-Sequenzen ligiert werden. Genannte Sequenzen, im Folgenden als "Adaptoren" bezeichnet, können einzelsträngige überhängende Enden aufweisen. Die Adaptoren können z. B. mittels eines thermolabilen Ligaseenzym, wie T4 DNA-Ligase, angehängt werden. Die Ligase wird dann vor der chemischen Modifikation der DNA-Probe durch Hitze denaturiert. Die Adaptoren können eine solche Sequenz aufweisen, dass sie trotz der chemischen Behandlung zur Unterscheidung von methylierten und unmethylierten DNA-Sequenzen unmodifiziert bleiben. Genannte Adaptoren können zur enzymatischen Amplifikation der DNA-Probe verwendet werden, indem sie ein Target für die Hybridisierung von Oligonukleotid-Primern darstellen. Die Verwendung von Adaptor-Molekülen ist im Stand der Technik wohl bekannt und wird des-

halb nicht weiter ausgeführt.

**[0034]** Die Proben-DNA wird dann chemisch behandelt, um die methylierte Cytosin-Basen zu Uracil umzusetzen. Die chemische Modifikation kann z. B. (aber nicht begrenzt auf) mittels einer Bisulfit-Lösung erfolgen. Genannte chemische Umsetzung kann mittels jeder im Stand der Technik bekannten Form erfolgen. Das schließt die Modifikation in Agarose-Gel oder in denaturierenden Lösemitteln ein, ist aber nicht darauf beschränkt.

**[0035]** Wenn die chemische Modifikation durch Bisulfit-Behandlung der DNA stattfindet, können die folgenden Schritte erfolgen:

Die doppelsträngige DNA muss denaturiert werden. Dies kann durch Hitze-Denaturierung geschehen, die bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt wird. Für eine DNA mit hohem Molekulargewicht ist die Denaturierungstemperatur gewöhnlich größer als 90°C. Jedoch kann die Analyse von kleineren Fragmenten erfolgen, die keine so hohen Temperaturen benötigen. Zusätzlich nimmt die Komplexität zwischen den Strängen ab, wenn die Reaktion voranschreitet und die Cytosin-Reste zu Uracil umgesetzt werden. Deshalb kann ein cyclisches Reaktionsprotokoll verschiedene Denaturierungstemperaturen umfassen.

**[0036]** Die Bisulfit-Umsetzung umfasst des weiteren zwei wichtige Schritten, der Sulfonierung des Cytosins und der nachfolgenden Deaminierung. Die Reaktionsgleichgewichte sind bei zwei unterschiedlichen Temperaturen für jede Stufe der Reaktion auf der richtigen Seite. Berücksichtigt man die Reaktionskinetiken, ist es bevorzugt, dass die Reaktion unter cyclischen Bedingungen stattfindet, mit wechselnden Temperaturen, stattfindet. Die Temperaturen und Reaktionszeiten, bei denen jede Stufe ausgeführt wird, können entsprechend den spezifischen Anforderungen im Einzelfall variiert werden. Jedoch umfasst eine bevorzugte Variante des Verfahrens eine Temperaturänderung von 4°C (10 Minuten) auf 50°C (20 Minuten). Diese Art der Bisulfit-Umsetzung ist im Stand der Technik in Bezug auf WO 99/28498.

**[0037]** Diese chemische Umsetzung kann in jeder im Stand der Technik bekannten Form stattfinden. Das schließt ein, ist aber nicht begrenzt auf, die Modifizierung innerhalb von Agarose-Gelen, in denaturierenden Lösemitteln oder innerhalb von Kapillaren.

**[0038]** Bisulfit-Umsetzung innerhalb von Agarose-Gel ist im Stand der Technik und wurde von Olek et al. Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066 beschrieben. Das DNA-Fragment wird in Agarose-Gel eingebettet, und die Umsetzung von Cytosin zu Uracil findet mittels Hydrogensulfit und einem Radikalfänger statt. Die DNA kann dann amplifiziert werden, ohne dass weitere Reinigungsschritte nötig sind.

**[0039]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die DNA-Umsetzung ohne Agarose-Matrix stattfinden. Die DNA kann bei erhöhten Temperaturen mit Hydrogensulfit und einem Radikalfänger inkubiert werden. Diese Reaktion findet in einem organischen, denaturierenden Lösemittel statt. Beispiele für denaturierende Lösemittel umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf, Polyethylenglykoldialkyl Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, DMSO oder THF.

**[0040]** In einer weiteren Ausführungsform wird die DNA-Probe vor der chemischen Behandlung in eine beheizbare Kapillare überführt, die für kleine Moleküle permeabel ist. Die Reaktionsschritte der chemischen Modifikation können dann in den Kapillarenröhrchen, mittels Zugabe und Entfernen von Reagenzien durch verbundene Kapillaren ausgeführt werden.

[0041] Im Anschluss an die chemische Behandlung können die zwei DNA-Stränge nicht länger komplementär sein.

[0042] Fraktionen der so behandelten genomischen DNA werden dann unter Verwendung von Oligonukleotid-Primer enzymatisch amplifiziert. Diese Oligonukleotide, welche zum Beispiel komplementär zum Adaptor-Molekül sein können, werden im weiteren als Typ-A-Primer bezeichnet. Die Länge und Gestaltung dieser Primer kann für den zu analysierenden Bereich des Genoms spezifisch sein. Als solche ist eine große Auswahl an Primern zur Verwendung für diese Technik geeignet. Solche Primer-Gestaltung ist Stand der Technik. Die Amplifikation kann derartig sein, dass ein Strang des Doppelstranges bevorzugt amplifiziert wird, d. h. dass ein Strang in größerer Menge amplifiziert wird als der andere.

[0043] Die amplifizierte DNA-Lösung wird dann mit thermolabilen Enzymen behandelt. Überschüssige dNTPs werden unter Verwendung von Phosphatase, z. B. alkalische Garmelen-Phosphatase, verdaut. Das Enzym wird dann mittels Hitzebehandlung denaturiert.

[0044] Das besondere der Erfindung liegt in der Analyse der mit Bisulfit-behandelten DNA. Bei anderen Arten der Methylierungs-Analyse ist ein Reinigungsschritt erforderlich, bevor die weitere Analyse der Methylierungsmuster stattfinden kann. Einer der Vorteile der Erfindung ist jedoch, dass die Amplifizierungsprodukte der Bisulfit-behandelten DNA in Lösung belassen werden können.

[0045] In einer Ausführungsform, betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Detektion von methylierten Positionen innerhalb Cytosin-reicher Nukleinsäure-Proben. In einer solchen Ausführungsform umfasst das Verfahren das in Kontakt bringen der Oligonukleotid-Primer und der Nukleotide mit der DNA-Lösung. Ein variabler Teil der Nukleotide kann mit einem fluoreszierenden Anteil markiert sein. Die vorliegende Erfindung beabsichtigt weiterhin den Gebrauch mehrerer fluoreszierender Spezies als Nukleotid-Markierungen, wobei jede Spezies einzigartig ist und unter Verwendung der Fluoreszenzpolarisation separat beobachtet werden kann. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Konzentration der fluoreszierend markierten Nukleotide niedriger oder gleich zur erwarteten Target-Stellen Konzentration ausgewählt. Der Oligonukleotid-Primer ist derart gestaltet, um zwischen 1-10 Basen upstream der zu analysierenden Target-Stelle zu hybridisieren. Die Primer und Sequenzen können unter zur Hybridisierung führenden Bedingungen zusammengebracht werden. Die Abschätzung der geeigneten Hybridisierungsbedingungen ist Stand der Technik. Die Primer werden dann unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase mit erhöhter Effizienz für Farbstoff-markierte Nukleotide, beispielsweise Ampli Taq, verlängert. In einer bevorzugten Ausführungsform findet dann die Primer-Extension dieser Primer mit den Fluoreszenz-markierten Nukleotiden statt.

[0046] Nach der erfolgten Primer-Extensionsreaktion, wird die Reaktionslösung mit einer Phosphodiesterase behandelt, wobei dieses Enzym die DNA in einer 5'- zu 3'-Richtung verdaut. Der Verdau wird ausgeführt um alle nicht spezifischen Nebenprodukte abzubauen, z. B. Typ-A-Primer, die am Amplifikat hybridisiert haben und mittels der Fluorophor-markierten Nukleotide verlängert wurden. Der Einbau der Fluorophor-markierten Nukleotide in ein solches Produkt führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzpolarisation und ergibt falsch-positive Ergebnisse. Die Typ-B-Oligonukleotide können derart gestaltet werden, dass eine blockierende Gruppe, wie ein Thiophosphat oder Methylphosphonate oder ihre Alkylderivate ohnen darauf beschränkt zu sein, eine oder mehrere Basenpositionen besetzt. Wenn diese in der Folge der Phosphodiesterase ausgesetzt werden, findet

der Verdau nur bis zur blockierten Basenposition statt. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Typ-A-Oligonukleotid-Primer und deren sein Extensionsprodukt vollständig verdaut.

[0047] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Fluoreszenzpolarisation der fluoreszierend markierten Nukleotide vor dem Einbau in die DNA-Duplex gemessen. Die Fluoreszenzpolarisation des fluoreszierend markierten Nukleotids wird dann nach dem Einbau in die DNA-Duplex gemessen. Ein Anstieg der FP korreliert mit dem Einbau der markierten Nukleotide in die Primer-Extension. Dieses Verfahren erlaubt die Analyse von Nukleinsäuren, die einer Normierung von Reaktionsbedingungen nicht zugänglich sind.

[0048] In einer weiteren Ausführungsform können die Nukleotide die Form von Dideoxynukleotiden (ddNTPs) haben. In einer solchen Ausführungsform wird der Einbau der Dideoxynukleotid-Nukleotide in die Primer-Extension die Primer-Extensionsreaktion beenden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann ein variabler Anteil des Nukleotids ddNTPs sein.

[0049] Es wird in Betracht gezogen, alle Reaktionsschritte in einem einzelnen Behälter stattfinden zu lassen. In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens kann die Reaktion an Feststoffoberflächen gebunden stattfinden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die genannte Primer-Extensionsreaktion durch eine Polymerasekettenreaktion ersetzt werden. In dieser Ausführungsform würden die markierten Nukleotide in die amplifizierten Sequenzen eingebaut werden und zu einem Anstieg der Fluoreszenzpolarisation führen. In einer solchen Ausführungsform ist es vorteilhaft, dass die Konzentration an markierten Nukleotiden im Überschuss zur ursprünglichen Target-Sequenz ist. In einer solchen Ausführungsform können die Nukleotide während mehrfacher PCR-Zyklen eingebaut werden, um so einen Anstieg des Signals zu bewirken.

[0050] In einer weiteren Ausführungsform kann die Erfindung die Form eines Kits annehmen. Die Komponenten dieses Kits sollten Behältnisse für folgende Substanzen in ausreichender Menge umfassen, um die Ausführungsbeispiele auszuführen:

- 1) Nukleinsäure-Primer
- 2) Fluorophor-markierte Nukleotide
- 3) Eine DNA-Polymerase, die mit dem Primer, Probe und Nukleotid reagiert, um eine 3'-Extension eines Polynukleotids zu erzeugen
- 4) Gebrauchsanweisung
- 5) Reagenzien für die Bisulfit-Umsetzung der Proben-DNA zur Bisulfit-Sequenz

[0051] Der Begriff "Gebrauchsanweisung" sollte einen fassbaren Ausdruck abdecken, um die Reagenz-Konzentration für das Assay-Verfahren, Parameter wie die relative Menge der zusammen zu führenden Reagenzien, Reaktionszeiten für Reagenzien/Proben-Mischungen, Temperatur, Puffer-Bedingungen und dergleichen zu beschreiben.

[0052] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann ein variabler Anteil der Nukleotide die Form von Dideoxynukleotiden haben.

[0053] Zahlreiche Varianten von Fluorophoren sind zur Verwendung für Fluoreszenzpolarisations-Techniken geeignet. Die Auswahl geeigneter Fluorophore ist Stand der Technik. Bevorzugte Fluorophore umfassen, aber sind nicht begrenzt auf 5'-Carboxyfluorescein (FAM), 6-Carboxy-X-rhodamin (ROX); N,N,N,N'-Tetramethyl-6-carboxy-X-rhodamin (TMR); BODIPY-Texas-Red (BTR), CY5, CY3, FITC, DAPI, HEX und TET. Die Anlagerung der fluoreszie-

renden Marker an das Nukleotid ist Stand der Technik. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, wird die Länge der Linker, welche verwendet werden um den Fluorophor an die Basen der Nukleinsäuren anzulagern, so klein wie möglich gehalten, um eine maximale Starrheit zu erreichen. Kurze und/oder starre Linker halten die Bewegung der Fluorophore, relativ zum Oligonukleotid, auf einem Minimum. Das ermöglicht eine Steigerung der Empfindlichkeit des Assays.

[0054] Die Empfindlichkeit des Assays kann auch dadurch erhöht werden, dass die rotatorische Bewegungsfähigkeit der Bisulfit-behandelten DNA oder des Primers durch Erhöhung deren Masse verringert wird. In einer bevorzugten Ausführungsform kann die Erhöhung der Masse durch Bindung der amplifizierten DNA an kleine Glaskugeln, kleine Latex-Kugeln sowie hydrophil-funktionalisierte Makromoleküle oder Dendrimere erreicht werden. Die Bindung solcher Moleküle wird in der Patentanmeldung WO 0023785 beschrieben, welche hiermit durch Bezugnahme Teil der Offenbarung wird.

[0055] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können die Primer vor Hybridisierung mit Bisulfit-behandelter DNA an einer Oberfläche immobilisiert sein. Die Oberfläche oder feste Phase kann z. B., ohne darauf beschränkt zu sein, eine Kugel (bead), ein Microplate-Well oder ein DNA-Chip sein. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können auch andere Reagenzien der Reaktion, wie die Polymerase, an die Oberfläche gebunden werden. In dieser Ausführungsform können alle Reagenzien an einer Microplate-Well fixiert werden, so dass das Assay einfach durch Zugabe geeigneter Puffer und der Bisulfit-behandelten DNA-Probe ausgeführt werden kann.

[0056] Es wird vorausgesetzt, dass dieses Verfahren für die Analyse genomischer DNA-Proben mit hohem Durchsatz verwendet wird. Deshalb umfassen die Ansprüche auch ein Verfahren zur Analyse von Daten unter Verwendung von Rechneranlagen. In einer bevorzugten Ausführungsform kann diese Vorrichtung eine oder mehrere Datenbanken umfassen. In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform kann diese Vorrichtung einen oder mehrere "lernende Algorithmen" umfassen.

#### Beschreibung der Diagramme

[0057] Fig. 1: Inkorporations-Assay:

A – Genomisches DNA-Fragment, worin die Target-Sequenz methyliert ist;

B – Genomisches DNA-Fragment, worin die Target-Sequenz nicht methyliert ist.

[0058] Die genomische DNA wird chemisch so modifiziert, dass unmethylierte Cytosin-Basen zu Uracil (1) umgesetzt werden. Die Target-Stelle wird durch Polymerasekettenreaktion (2) amplifiziert. Die Amplifikation kann so durchgeführt werden, dass nur ein Strang amplifiziert wird. Die amplifizierte Sequenz unterscheidet sich von genomischer Sequenz dadurch, dass methyliertes Cytosin durch Thymin ersetzt wird, weshalb die doppelten Stränge der DNA nicht länger komplementär sein können.

[0059] Die überschüssigen Nukleotide können dann mittels einer Phosphatase (3) verdaut werden. Der Oligonukleotid-Primer (5) und Farbstoff-markierte Nukleotide (6) werden dann mit dem Amplikon in Kontakt gebracht. Der Primer wird mit dem Amplikon hybridisiert, und zwar in einem Abstand von 1–10 Basen zur der Stelle, die analysiert werden soll und unter Verwendung von Farbstoff-markierten Nukleotiden (7) verlängert. Die Reaktionslösung wird mittels Phosphodiesterase verdaut und die Fluoreszenzpolarisation einer jeden Markierung gemessen (8).

[0060] Fig. 2: Messung der Fluoreszenzpolarisation:

Nicht polarisiertes Licht (1) einer Lichtquelle (2) wird durch Polarisations- und Farbfilter (3) geleitet. Das linear polarisierte Licht (4A) wird dann vor dem Nukleotid-Einbau durch die Reaktionslösung geleitet. Das polarisierte Licht regt den Fluoreszenzmarker (5), gebunden an das Nukleotid (6), derart an, dass der Fluoreszenzmarker Licht emittiert (7). Da das Nukleotid frei in Lösung ist, hat dieses und der Fluoreszenzmarker ein hohes Maß an Bewegung, und die Emissionen sind nicht polarisiert (7).

[0061] Das markierte Nukleotid wird dann in eine größere Nukleinsäure (8) eingebaut. Aufgrund des Anstiegs des Molekulargewichts hat der Fluoreszenzmarker jetzt ein geringeres Maß an Bewegung. Daher weisen die Emissionen (9) einen höheren Grad an Polarisation auf, wenn die Anregung durch linear polarisiertes Licht (4B) erfolgt. Die Emissionen werden dann durch Polarisations- und Farbfilter geleitet (10). Die Emissionen werden mittels eines Fluorimeters gemessen (11).

[0062] Fig. 3: Phosphodiesterase-Verdau von Nebenprodukten:

Das Amplifikat (1) mit der Target-Stelle (2) wird mit einem Typ-B-Oligonukleotid-Primer (3) hybridisiert. Das Typ-B-Oligonukleotid (3) trägt eine Gruppe (4), die den Nuklease-Verdau blockiert, und das Oligonukleotid (3) wird mittels Fluoreszenz-markierten Nukleotiden (5A) verlängert. Ein Typ-A-Oligonukleotid (6) aus einer vorhergehenden Reaktion hat sich auch an das Amplifikat angelagert und ist mittels fluoreszenzmarkierter Nukleotide (5B) verlängert worden, was zu einem Anstieg der Fluoreszenzpolarisation führt, die unabhängig vom Status der Target-Stelle ist.

[0063] Die Reaktionslösung wird mittels Phosphodiesterase (7) verdaut, die vom 5'-Ende zum 3'-Ende verdaut. Das Typ-A-Primer-Nebenprodukt wird vollständig verdaut (8), die Fluoreszenz-markierten Nukleotide werden in die Lösung freigesetzt und die Fluoreszenzpolarisation verringert sich. Das Typ-B-Oligonukleotid-Produkt wird nur teilweise verdaut (9), da der vollständige Verdau durch die Gruppe (4) blockiert ist. Da die Fluoreszenz-markierten Nukleotide noch immer in einem größeren Molekül eingebaut sind, ist die Fluoreszenzpolarisation hoch.

#### Referenzen

##### Artikel

- Sanchez-Cespedes, M. et al., "Gene promoter hypermethylation in tumours and serum of head and neck cancer patients", *Cancer Res.* 2000, Feb. 15; 60 (4): 892–5
- Garcia, J. F. et al., "Loss of p16 protein expression associated with methylation of the p16INK4A gene is a frequent finding in Hodgkin's disease", *Lab. invest.* 1999 Dec; 79 (12): 1453–9
- Yanagisawa, Y. et al., "Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability", *Int. J. Cancer* 2000, Jan 1; 85 (1): 50–3
- Zeschnigh et al., "Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method", *Human Mol. Genetics* (1997) (6) 3 pp 387–395
- Tuck-Muller et al., "CMDNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients", *Cytogenet. Cell genet.* 2000; 89(1–2): 121–8
- Chen, T. C. et al., "Dermatofibroma is a clonal proliferative disease", *J. Cutan Pathol.* 2000 Jan; 27 (1): 36–9
- Lee, S. D. et al., "Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hyperten-



- sion", J. clin. Invest. 1998, Mar 1, 101 (5): 927-34
- Klauck, S. M. et al., "Molecular genetic analysis of FMR-1 gene in a large collection of autistic patients", Human Genet. 1997 Aug; 100 (2): 224-9
- Hornstra, I. K. et al., "High resolution methylation analysis of the FMR1 gene trinucleotide repeat region in fragile X syndrome", Hum. Mol. Genet. 1993 Oct, 2(10): 1659-65
- Ferluga, J. et al., "Possible Organ and age related epigenetic factors in Huntington's disease and colorectal carcinoma", Med. hypotheses 1989 May; 29(1): 51-4
- Bird, A. P., Southern, E. M., J. Mol. Biol. 118, 27-47
- Shemer, R. et al., PNAS 93, 6371-6376
- Kirpekar, F. et al., "DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry", Nucleic Acid Research; 26, 2354-9
- Jolley, M. E., J. Analytical Toxicology, 1981 (5), 236-240

## Patente

- EP 0382433 B1
- WO 92/18650
- WO 00/11220
- WO 99/28498

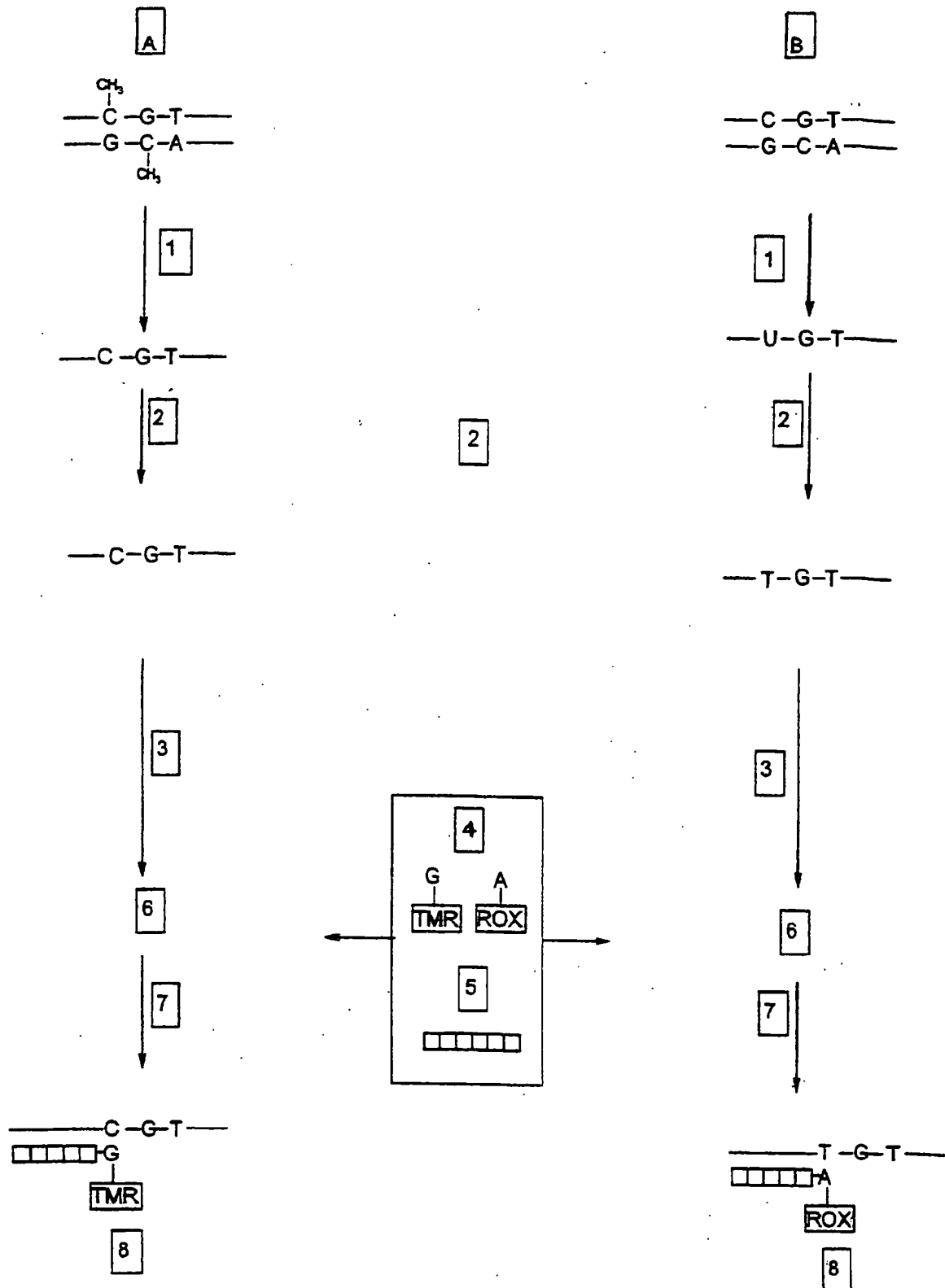
## Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse der Methylierung von Cytosin-Basen in genomischen DNA-Proben, die folgenden Schritte umfassend:
  - (a) die genomische DNA wird in einer solchen Art chemisch behandelt, dass Cytosin zu Uracil oder einer gleichartigen Base bezüglich des Basenpaarungsverhaltens in der DNA-Duplex umgesetzt wird, 5-Methylcytosin bleibt jedoch unverändert;
  - (b) die chemisch behandelte DNA wird unter Verwendung von mindestens einer Oligonukleotid-Spezies (Typ A) als Primer in einer Polymerasereaktion amplifiziert;
  - (c) das Amplifikat wird mit einer oder mehreren Spezies von Fluorophor-markierten Nukleotiden und einer oder mehreren Oligonukleotid-Spezies (Typ B) in der Lösung belassen, worin das Typ B Oligonukleotid unter geeigneten Bedingungen mit seinem 3'-Ende direkt an oder bis zu 10 Basen von der zu untersuchenden Position entfernt, hybridisiert und worin genanntes Typ B Oligonukleotid zumindest teilweise nukleaseresistent ist;
  - (d) das hybridisierte Oligonukleotid (Typ B) wird mittels einer Polymerase durch mindestens ein Nukleotid verlängert, wodurch die Extension vom Methylierungsstatus der jeweiligen Cytosin-Position in der genomischen DNA-Probe abhängig ist;
  - (e) die Lösung wird mit einer Phosphodiesterase inkubiert, die geeignet ist Nukleinsäuren zu verdauen, jedoch die Typ B Oligonukleotide und deren Extensionsprodukte unvollständig verdaut;
  - (f) die Fluoreszenzpolarisation der Lösung wird gemessen, wobei man für jeden verwendeten Fluoreszenzmarker den Grad der Polarisation bestimmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin alle oder ein variabler Anteil der Fluorophor-markierten Nukleotide Dideoxynukleotide sind.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, wobei nach der Polymerase-Amplifikation der Bisulfit-DNA die Nukleotide der Polymerase-Reaktion mittels einer Phosphatase vermindert werden und die Phosphatase nachfolgend thermisch denaturiert wird.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, worin die Fluoreszenzpolarisation der Fluorophor-markierten Nukleotide und/oder Dideoxynukleotide vor dem Einbau in die DNA-Duplex und wiederum nach Einbau in die DNA-Duplex gemessen wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Primer-Extension durch einen Anstieg der Fluoreszenzpolarisation detektiert wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, worin genanntes Fluorophor ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus 5'-Carboxyfluorescein, 6-Carboxy-X-rhodamin, N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxy-X-rhodamin, BODIPY, TexasRed, Cy3, Cy5, FITC, DAPI, HEX und TET.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, wobei die DNA-Probe vor der Bisulfit-Behandlung mit Restriktionsendonukleasen gespalten wird.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, wobei die DNA-Probe aus menschlichen Quellen, z. B. Zell-Linien, Blut, Sputum, Faeces, Urin, Gehirn, Cerebrospinalflüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, zum Beispiel Augengewebe, Gedärme, Niere, Gehirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Schnitte und allen möglichen Kombinationen, isoliert wird.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, worin die Fluoreszenzpolarisation der enzymatisch amplifizierten DNA direkt in dem Behälter gemessen wird, in dem die Polymerase-Reaktion durchgeführt wurde.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, worin die Typ B Primer vor der Hybridisierung mit dem Amplifikat an Oberflächen immobilisiert werden.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, worin die Bisulfit-behandelte DNA vor der Hybridisierung mit den Fluorophor-markierten Nukleotiden an einer Oberfläche immobilisiert wird.
12. Verfahren nach den Ansprüchen 10 und 11, wobei die Oberfläche Silikon, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold umfasst.
13. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, wobei die über den Methylierungs-Status der Target-Stelle erzeugte Information einer Rechneranlage bereitgestellt wird, welche eine oder mehrere Datenbanken umfasst.
14. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, wobei die über den Methylierungs-Status der Target-Stelle erzeugte Information einer Rechneranlage bereitgestellt wird, welche eine oder mehrere lernende Algorithmen umfasst.
15. Diagnostik-Kit umfassend:
  - a) einen oder mehrere Oligonukleotid-Primer, gestaltet, um mit Bisulfit-behandelter DNA-Sequenz innerhalb von 1-10 Basen 3' von der Target-Stelle zu hybridisieren;
  - b) wenigstens eine Nukleotid-Spezies, worin jede Nukleotid-Spezies kovalent mit einem einzigartigen Fluorophor verknüpft ist;
  - c) DNA-Polymerase, die mit dem Oligonukleotid-Primer und Nukleotiden reagiert, um eine 3'-Extension des Primers herzustellen.
16. Kit nach Anspruch 14, worin alle oder ein variabler Anteil der Fluorophor-gebundenen Nukleotide in der Form von Dideoxynukleotiden vorliegen.

- Leerseite -

Figur 1



Figur. 2

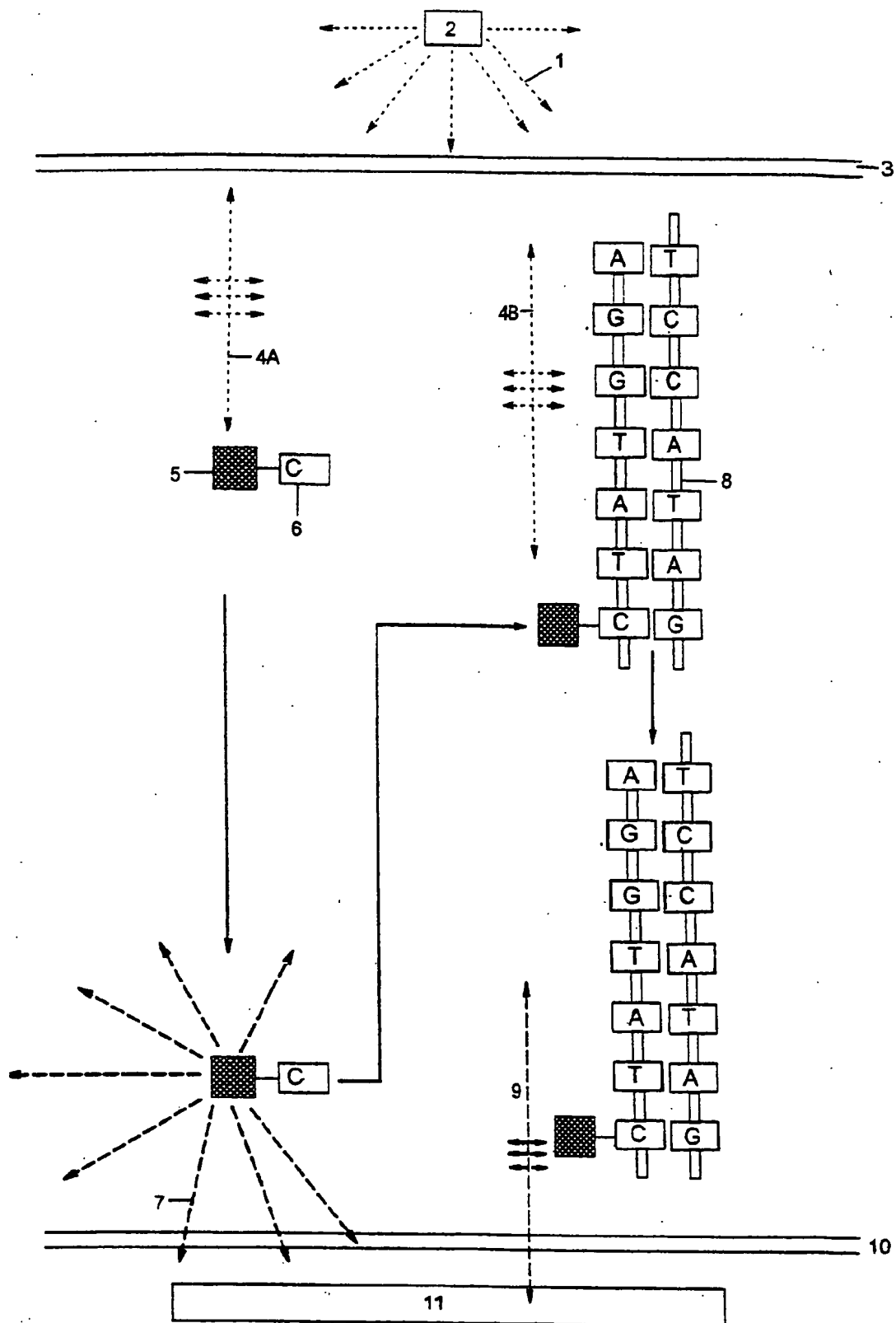


Figure 3

